

METHOD FOR ASSAYING NUCLEIC ACID ENCODING EOTAXIN, RANTES OR BETA-DEFENSIN-2, REAGENT THEREFOR, AND METHOD FOR SCREENING ANTIINFLAMMATORY AGENT

Patent number: JP2002186485
Publication date: 2002-07-02
Inventor: SHIBATA MICHIO; HARIGAI TAKESHI; ICHIKAWA HIDEYUKI
Applicant: SHISEIDO CO LTD
Classification:
- international: A61K45/00; A61P29/00; A61P37/08; C12N15/09; C12Q1/68; G01N33/15; G01N33/50; G01N33/53; G01N33/566; A61K45/00; A61P29/00; A61P37/00; C12N15/09; C12Q1/68; G01N33/15; G01N33/50; G01N33/53; G01N33/566; (IPC1-7): C12N15/09; A61K45/00; A61P29/00; A61P37/08; C12Q1/68; G01N33/15; G01N33/50; G01N33/53; G01N33/566
- european:
Application number: JP20000391265 20001222
Priority number(s): JP20000391265 20001222

[Report a data error here](#)

Abstract of JP2002186485

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a specific combination of primers and a probe effective for assaying a nucleic acid encoding eotaxin, RANTES or β -defensin-2 that are known to promote the short-circuited consumption of energy. **SOLUTION:** A method for assaying a gene as a template by PCR using a pair of PCR primers and a probe that hybridizes to a site between the primers on a template and is bound to a reporter and a quencher, wherein the method permits assaying a gene, particularly an mRNA, encoding eotaxin, RANTES or β -defensin-2 and a kit therefor are provided. These are useful for evaluating or selecting a substance having an antiinflammatory activity.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-186485

(P2002-186485A)

(43) 公開日 平成14年7月2日 (2002.7.2)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	デフォルト* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
A 6 1 K 45/00		A 6 1 P 29/00	4 B 0 2 4
A 6 1 P 29/00		37/08	4 B 0 6 3
37/08		C 1 2 Q 1/68	A 4 C 0 8 4
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/15	Z
審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 17 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-391265 (P2000-391265)

(22) 出願日 平成12年12月22日 (2000. 12. 22)

(71) 出願人 000001959

株式会社資生堂

東京都中央区銀座7丁目5番5号

(72) 発明者 柴田 道男

神奈川県金沢区福浦2-12-1 株式会社
資生堂リサーチセンター内

(72) 発明者 針谷 毅

神奈川県金沢区福浦2-12-1 株式会社
資生堂リサーチセンター内

(74) 代理人 100077517

弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エオタキシン、RANTES又は β -ディフェンシン-2の核酸の測定方法及びそのための試薬、並びに抗炎症剤のスクリーニング方法

(57) 【要約】

【課題】 エオタキシン、RANTES又は β -ディフェンシン-2をコードする遺伝子の新規な測定方法及びそれを利用した抗炎症活性物質の評価又は選択方法の提供。

【解決手段】 1対のPCRプライマーと、鋳型上の該プライマーに挟まれた位置にハイブリダイズする、レポーターとクエンチャーを結合したプローブを用いて、PCR法により鋳型としての遺伝子を測定する方法において、特定のプライマーと特定のプローブとを用いて、エオタキシン、RANTES又は β -ディフェンシン-2をコードする遺伝子特にmRNAを測定する方法、並びにそのためのキットを提供する。これらは、抗炎症作用を有する物質の評価又は選択のために有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 フォワードプライマー及びリバースプライマー、並びにレポーターとクエンチャーを有し前記両プライマーに挟まれた領域内で鋳型核酸とハイブリダイズするプローブを用い、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼによりポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行うことによってエオタキシン、RANTES又はβ-ディフェンシン-2のmRNA又はcDNAを測定する方法において、

(1) エオタキシンをコードするmRNA又はcDNAを測定するために、前記一方のプライマーとしてエオタキシンをコードする核酸のヌクレオチド170～189の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、他方のプライマーとして前記核酸のヌクレオチド301～320の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、そして前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド191～223の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い；あるいは、

(2) RANTESをコードするmRNA又はcDNAを測定するために、前記一方のプライマーとしてRANTESをコードする核酸のヌクレオチド50～71の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、他方のプライマーとして前記核酸のヌクレオチド274～300の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、そして前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド73～94の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い；あるいは、

(3) β-ディフェンシン-2をコードするmRNA又はcDNAを測定するために、前記一方のプライマーとしてβ-ディフェンシン-2をコードする核酸中のヌクレオチド84～104の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、他方のプライマーとして前記核酸中のヌクレオチド276～295の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、そして前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド108～139の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用いる；ことを特徴とするmRNA又はcDNAの測定方法。

【請求項2】 前記プライマー及びプローブが20～40のヌクレオチドから成るオリゴヌクレオチドである、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記プライマー及びプローブが次のヌクレオチド配列：

エオタキシン遺伝子測定用

フォワードプライマー 5'-GCCAGCTTCTGTCCCAACCA-3' (配列番号：4)

リバースプライマー 5'-GGCACAGATATCCTTGGCCA-3' (配列番号：5)

プローブ 5'-CTGCTGCTTTAACCTGGCCAATAGGAAGATACC-3' (配列番号：6)

を有するか；あるいは

RANTES遺伝子測定用

フォワードプライマー 5'-CGCTCTCATCCTCATTGCTACT-3' (配列番号：7)

リバースプライマー 5'-AGCTCATCTCCAAAGAGTTGATGTA-3' (配列番号：8)

プローブ 5'-CCCTCTGCGCTCCTGCATCTGC-3' (配列番号：9)；または

β-ディフェンシン遺伝子測定用

フォワードプライマー 5'-GCCTCTCCAGGTGTTTTTGG-3' (配列番号：10)

リバースプライマー 5'-CGCACGTCTCTGATGAGGGA3' (配列番号：11)

プローブ 5'-TATAGGCGATCCTGTTACCTGCCTTAAGAGTGG-3' (配列番号：12)

を有するか；あるいは該配列中の4個以下のヌクレオチドの置換、欠失及び／又は付加により修飾されており、且つ対応する領域にハイブリダイズすることができるヌクレオチド配列を有する、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】 対照としてさらに、グリセロアルデヒド-3-ホスフェート・デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子中の、一方のプライマーとしてヌクレオチド66～84の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを使用し、他方のプライマーとしてヌクレオチド272～291の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを使用し、そしてプローブとしてヌクレオチド242～262の領域のオリゴヌクレオチドを用いて、グリセロアルデヒド-3-ホスフェート・デヒドロゲナーゼ遺伝子を測定する、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】 前記グリセロアルデヒド-3-ホスフェート・デヒドロゲナーゼ測定用として、次のヌクレオチド配列：

フォワードプライマー 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC (配列番号：13)

リバースプライマー 5'-GAAGATGGTATGGGATTTTC (配列番号：14)

プローブ 5'-AGGCTGAGAACGGGAAGCTTG (配列番号：15)

を有するか、又は4個以下のヌクレオチドの置換、欠失及び／又は付加により修飾されており且つ対応する領域にハイブリダイズすることができるプライマー及びプローブを用いる、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 フォワードプライマー及びリバースプライマー、並びにレポーターとクエンチャーを有し前記両プライマーに挟まれた領域内で鋳型核酸とハイブリダイズするプローブを含んで成る、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼによりポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行うことによってエオタキシン、RANTES又はβ-ディフェンシン-2のmRNA又はcDNAを測定するためのキットであって、

(1) エオタキシンをコードするmRNA又はcDNAを測定す

るために、前記一方のプライマーとしてエオタキシンをコードする核酸のヌクレオチド170～189の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、他方のプライマーとして前記核酸のヌクレオチド301～320の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、及び前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド191～223の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド；あるいは、

(2) RANTESをコードするmRNA又はcDNAを測定するために、前記一方のプライマーとしてRANTESをコードする核酸のヌクレオチド50～71の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、他方のプライマーとして前記核酸のヌクレオチド274～300の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、及び前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド73～94の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド；あるいは、

(3) β -ディフェンシン-2をコードするmRNA又はcDNAを測定するために、前記一方のプライマーとして β -ディフェンシン-2をコードする核酸中のヌクレオチド84～104の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、他方のプライマーとして前記核酸中のヌクレオチド276～295の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、及び前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド108～139の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド；を含み、前記プライマー及びプローブが15～40個のヌクレオチドから成るオリゴヌクレオチドであることを特徴とするmRNA又はcDNAの測定用キット。

【請求項7】 前記プライマー及びプローブが20～30のヌクレオチドから成るオリゴヌクレオチドである、請求項6に記載のキット。

【請求項8】 前記プライマー及びプローブが次のヌクレオチド配列：

エオタキシ遺伝子測定用

フォワードプライマー 5'-GCCAGCTTCTGTCCCAACCA-3' (配列番号：4)

リバースプライマー 5'-GGCACAGATATCCTTGGCCA-3' (配列番号：5)

プローブ 5'-CTGCTGCTTTAACCTGGCCAATAGGAAGATACC-3' (配列番号：6)；

または

RANTES遺伝子測定用

フォワードプライマー 5'-CGCTCTCATCCTCATTGCTACT-3' (配列番号：7)

リバースプライマー 5'-AGCTCATCTCCAAGAGTTGATGTA-3' (配列番号：8)

プローブ 5'-CCCTCTGCGCTCCTGCATCTGC-3' (配列番号：9)；または

β -ディフェンシン-2遺伝子測定用

フォワードプライマー 5'-GCCTCTCCAGGTGTTTTTGG-3' (配列番号：10)

リバースプライマー 5'-CGCACGTCTCTGATGAGGGA3'

(配列番号：11)

プローブ 5'-TATAGGCGATCCTGTTACCTGCCTTAAGAGTGG-3' (配列番号：12)

を有するか；あるいは該配列中の4個以下のヌクレオチドの置換、欠失及び／又は付加により修飾されており、且つ対応する領域にハイブリダイズすることができるヌクレオチド配列を有する、請求項6又は7に記載のキット。

【請求項9】 対照としてさらに、グリセロアルデヒド-3-ホスフェート・デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子中の、一方のプライマーとしてヌクレオチド66～84の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、他方のプライマーとしてヌクレオチド272～291の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、及びプローブとしてヌクレオチド242～262の領域のオリゴヌクレオチドを含む請求項6～8のいずれか1項に記載のキット。

【請求項10】 前記グリセロアルデヒド-3-ホスフェート・デヒドロゲナーゼ測定用として、次のヌクレオチド配列：

フォワードプライマー 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC (配列番号：13)

リバースプライマー 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC (配列番号：14)

プローブ 5'-AGGCTGAGAACGGGAAGCTTG (配列番号：15)

を有するか、又は4個以下のヌクレオチドの置換、欠失及び／又は付加により修飾されており且つ対応する領域にハイブリダイズすることができるプライマー及びプローブを用いる、請求項9に記載のキット。

【請求項11】 抗炎症作用を有する薬剤の評価又は選択方法において、エオタキシ、RANTES又は β -ディフェンシン-2を発現し得る細胞を被験試料の存在下で培養し、エオタキシ、RANTES又は β -ディフェンシン-2をコードするmRNAの量を請求項1～5のいずれか1項に記載の方法、又は請求項6～10のいずれか1項に記載のキット、により測定することを特徴とする方法。

【請求項12】 請求項1～5のいずれか1項に記載の方法により、又は請求項1～10のいずれか1項に記載のキットにより評価された薬剤活性成分とする抗炎症剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、エオタキシ、RANTES又は β -ディフェンシン-2のmRNA又はcDNAの測定方法及びそのためのキットに関する。本発明は、例えば抗炎症剤のスクリーニング方法又はアトピー性皮膚炎の治療剤のスクリーニング方法として有用である。

【0002】

【従来の技術】 皮膚の刺激性炎症又はアレルギー性炎症の際には、炎症部位に好中球や好酸球などの炎症細胞が

遊走し、活性化され、炎症の発生に関与することが知られており、この場合に炎症細胞の遊走及び活性化に関与するケモカイン(chemokine)としてインターロイキン-8 (IL-8)、エオタキシン (eotaxin)、RANTES (Regulated upon Activation, Normal T Expressed and Secreted)、 β -ディフェンシン-2などが知られている。

【0003】従って、炎症細胞によるこれらのケモカインの産生を抑制する物質を選択することにより抗炎症剤の選択が可能となる。この場合、ケモカインの産生を測定する方法としては、生成したIL-8、エオタキシン、などを測定する方法が考えられるが、より直接的、高感度にこれらのケモカインの発現を測定するには、それらをコードするmRNAを測定するのが好ましい。しかしながら、遺伝子発現の定量的な測定は従来から困難であり、コンパラティブPCR法、コンペティティブPCR法、ノーザンブロットング法等によって半定量されていた。

【0004】ポリメラーゼが連鎖反応法(PCR法)は核酸の増幅方法として広く使用されている。このPCR法の1用途として、リポーター色素1とクエンチャー色素2を結合させたプローブを用いて核酸を測定する方法がある。この方法においては、PCR法において使用するフォワードプライマーがハイブリダイズする鋳型上の部位とリバースプライマーがハイブリダイズする鋳型上の部位とに挟まれた鋳型上の部位にハイブリダイズし、且つリポーター色素1とクエンチャー色素2が結合しているプローブを用い、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼを用いてPCR反応を行う。

【0005】例えば、図1の(A)～(D)において、フォワードプライマーがDNAポリメラーゼの使用により伸長してプローブに対すると、プローブを構成するオリゴヌクレオチドは、DNAポリメラーゼが有する5'→3'エキソヌクレアーゼ活性の作用により分解され、その後を追ってフォワードプライマーの伸長生成物が生成する。

【0006】この場合、レポーター1とクエンチャー2がプローブに結合している間は近い位置にある両者の相互作用により蛍光を発しないが、プライマーの伸長と共にプローブを構成するオリゴヌクレオチドが分解されればレポーター1とクエンチャー2が切り離され、レポーター1はクエンチャー2の作用を受けないので紫外線の照射により蛍光を発する。従って、特定のDNAに特異的にハイブリダイズするプライマー及びプローブを選択することにより、蛍光強度によって特定の核酸を選択的に測定することができる。この方法はすでにTaq ManPCR(商標)等として広く使用されている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】上記の方法においては、被験核酸、すなわち鋳型核酸上の上記のごとき位置関係にある1対のプローブ、及びプローブを選択する必要があるが、そのみならず同一のハイブリダイゼーシ

ョン条件下でプライマーよりも早くプローブが鋳型核酸にハイブリダイズしなければならない。なぜなら、プライマーの伸長生成物(1本鎖核酸)がプローブがハイブリダイズすべき位置を超えて伸長してしまえば、もはやプローブがハイブリダイズすることができず、従ってDNAポリメラーゼの5'→3'エキソヌクレアーゼ活性により分解されることもできないからである。

【0008】特定のヌクレオチド配列が既知である2つの核酸がハイブリダイズする場合のハイブリダイズの生じやすさは、融点(T_m)の計算によりある程度推定することができる。しかしながらこの推定によって選択したプライマーとプローブとの組合せが、必ずしも上記DNA測定法において好結果をもたらすわけではなく、測定すべき特定の核酸につき試行錯誤によりプローブとプライマーの組合せを選択する必要がある。

【0009】本発明は、例えば、抗炎症活性を有する薬剤等の評価又は選択のための、簡便で、効率的で、多数の被験物質を短時間で評価することができる手段を提供しようとするものであり、そのために、エオタキシン、RANTES又は β -ディフェンシン-2をコードする遺伝子の発現量、すなわちmRNA量を測定するための手段として、前記のPCR法を使用する。そして、本発明は、上記PCR法の実施のために特に適するプライマー対及びプローブを提供するものである。そこで本発明は、エネルギーの短絡的消費を促進することが知られているエオタキシン、RANTES又は β -ディフェンシン-2につき、これらをコードする核酸の測定のために有効なプライマーとプローブとの特定の組合せを提供しようとするものである。

【0010】

【課題を解決するための手段】上記の課題を解決するため、本発明は、フォワードプライマー及びリバースプライマー、並びにレポーターとクエンチャーを有し前記両プライマーに挟まれた領域内で鋳型核酸とハイブリダイズするプローブを用い、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼによりポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行うことによってmRNA又はcDNAを測定する方法において、下記のプライマー対及びプローブを使用する。

【0011】(1)エオタキシンをコードするmRNA又はcDNAを測定するために、前記一方のプライマーとしてエオタキシンをコードする核酸のヌクレオチド170～189の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、他方のプライマーとして前記核酸のヌクレオチド301～320の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、そして前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド191～223の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用いる。

【0012】エオタキシンをコードする遺伝子上のプライマー結合領域とプローブ結合領域の位置関係を図2に

示す。この配列は、Kitaura, M.ら、J.Biol.Chem.Vol.271 No.13, p.7725-7730 (1996)に記載されているヒトのエオタキシンをコードするcDNAの塩基配列である。この配列を配列番号：1に示し、図2の配列の1位が配列番号：1の配列の1位に相当する。図2において上流の下線部分がフォワードプライマーがハイブリダイズする領域であり、下流の下線部分がリバースプライマーがハイブリダイズする領域でありそしてそれらに挟まれた中間の下線部分がプローブがハイブリダイズする領域である。

【0013】エオタキシン遺伝子測定用の好ましいプライマー対及びプローブのヌクレオチド配列は次の通りである（図2において、それぞれ右方向の矢印を付した下線及び左方向の矢印を付した下線、並びにその間の矢印のない下線により示す）。

フォワードプライマー 5'-GCCAGCTTCTGTCCCAACCA-3'（配列番号：4）

リバースプライマー 5'-GGCACAGATATCCTTGGCCA-3'（配列番号：5）

プローブ 5'-CTGCTGCTTTAACCTGGCCAATAGGAAGATACC-3'（配列番号：6）。

【0014】（2）RANTESをコードするmRNA又はcDNAを測定するために、前記一方のプライマーとしてRANTESをコードする核酸のヌクレオチド50～71の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、他方のプライマーとして前記核酸のヌクレオチド274～300の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、そして前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド73～94の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用いる。

【0015】RANTESをコードする遺伝子上のプライマー結合領域とプローブ結合領域の位置関係を図3に示す。この配列は、Schall, T.J.ら、J.Immunol.Vol.141, p.1018-1025 (1988)に記載されているヒトのRANTESをコードするcDNAの塩基配列である。この配列を配列番号：2に示し、図3の配列の1位が配列番号：2の配列の1位に相当する。図3において上流の下線部分がフォワードプライマーがハイブリダイズする領域であり、下流の下線部分がリバースプライマーがハイブリダイズする領域でありそしてそれらに挟まれた中間の下線部分がプローブがハイブリダイズする領域である。

【0016】RANTES遺伝子測定用の好ましいプライマー対及びプローブのヌクレオチド配列は次の通りである（図3において、それぞれ右方向の矢印を付した下線及び左方向の矢印を付した下線、並びにその間の矢印のない下線により示す）。

フォワードプライマー 5'-CGCTCTCATCCTCATTGCTACT-3'（配列番号：7）

リバースプライマー 5'-AGCTCATCTCCAAGAGTTGATGTACT-3'（配列番号：8）

プローブ 5'-CCCTCTGCGCTCCTGCATCTGC-3'（配列番号：9）。

号：9）。

【0017】（3） β -ディフェンシン-2をコードするmRNA又はcDNAを測定するために、前記一方のプライマーとして β -ディフェンシン-2をコードする核酸中のヌクレオチド84～104の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、他方のプライマーとして前記核酸中のヌクレオチド276～295の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、そして前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド108～139の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用いる。

【0018】 β -ディフェンシン-2をコードする遺伝子上のプライマー結合領域とプローブ結合領域との位置関係を図4に示す。この配列を配列番号：3に示し、図4の配列の1位が配列番号：3の配列の1位に相当する。図4において上流の下線部分がフォワードプライマーがハイブリダイズする領域であり、下流の下線部分がリバースプライマーがハイブリダイズする領域であり、そしてそれらに挟まれた中間の下線部分がプローブがハイブリダイズする領域である。

【0019】 β -ディフェンシン-2遺伝子測定用の好ましいプライマー対及びプローブのヌクレオチド配列は次の通りである（図4において、それぞれ右方向の矢印を付した下線及び左方向の矢印を付した下線、並びにその間の矢印のない下線により示す）。 β -ディフェンシン-2遺伝子測定用の好ましいプライマー及びプローブのヌクレオチド配列は次の通りである。

フォワードプライマー 5'-GCCTCTCCAGGTGTTTGG-3'（配列番号：10）

リバースプライマー 5'-CGCACGTCTCTGATGAGGGA3'（配列番号：11）

プローブ 5'-TATAGGCGATCCTGTTACCTGCCTTAAGAGTGG-3'（配列番号：12）。

【0020】本発明においてはさらに、ヌクレオチド配列が知られている核酸を特異的に測定することができることが確認されているプライマー及びプローブを用いて該核酸を測定し、これを対照として用いることができる。この様な対照としてグリセロアルデヒド-3-ホスフェート・デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を用いることができる。この場合、グリセロアルデヒド-3-ホスフェート・デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子中の、一方のプライマーとしてヌクレオチド66～84の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを使用し、他方のプライマーとしてヌクレオチド272～291の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを使用し、そしてプローブとしてヌクレオチド242～262の領域のオリゴヌクレオチドを用いて、グリセロアルデヒド-3-ホスフェート・デヒドロゲナーゼ遺伝子を測定する。

【0021】グリセロアルデヒド-3-ホスフェート・デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子上のプライマーとプローブとの位置関係を図5に示す。この図において、

3本の下線を付した領域の意味は図2について記載した通りである。グリセロアルデヒド-3-ホスフェート・デヒドロゲナーゼ遺伝子測定用の好ましいプライマー及びプローブのヌクレオチド配列は次の通りである。

【0022】フォワードプライマー 5' GAAGGTGAAGGT CCGAGTC (配列番号:13)

リバースプライマー 5' GAAGATGGTGATGGGATTC (配列番号:14)

プローブ 5' AGGCTGAGAACGGGAAGCTTG (配列番号:15)

上記の種々のプライマー及びプローブ用のオリゴヌクレオチドのヌクレオチド数は15~40個、そして好ましくは20~30個である。プライマー及びプローブのサイズが長ければ、1本鎖DNAにハイブリダイズしにくくなり、短かすぎればハイブリダイゼーションの特異性が低下するからである。

【0023】プライマー及びプローブの上記の特定のヌクレオチド配列は特に好ましい配列であるが、例えば20ヌクレオチドからなるプライマー又はプローブは、鋳型鎖との間に少数のミスマッチが存在してもハイブリダイズし、PCRのプライマーとして、又は検出用プローブとして機能し得ることが知られている。従って本発明プライマー及びプローブは、上記の特定のヌクレオチド配列を有するものに限定されず、例えば上記の具体的なヌクレオチド配列に対して4個以下のヌクレオチドの置換、欠失及び/又は付加により修飾されており、且つ所定の

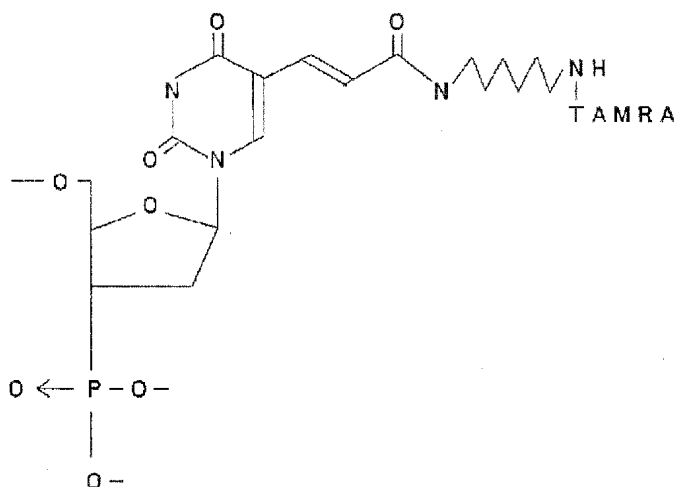
領域にハイブリダイズすることができるプライマー及びプローブも本発明に含まれる。

【0024】本発明に用いるプローブはその一端、例えば5'-末端にレポーター色素を結合しており、そして他端、例えば3'-末端にクエンチャー色素を結合している。レポーター色素が例えば紫外線の照射によって蛍光を発する物質であるのに対して、クエンチャーは、該レポーター色素に距離的に接近して存在する場合レポーター色素に作用して蛍光の発生を消去する作用を有するものである。レポーター色素としては、例えば6-カルボキシフルオレッセイン (FAM)、テトラクロロ-6-カルボキシフルオレッセイン (TET)、2,7-ジメトキシ-4,5-ジクロロ-6-カルボキシフルオレッセイン (JOE)、ヘキサクロロ-6-カルボキシフルオレッセイン (HEX)等が挙げられ、他方クエンチャー色素としては6-カルボキシ-テトラメチルローダミン (TAMRA)等が使用される。

【0025】プローブオリゴヌクレオチドへのレポーター色素及びクエンチャー色素の結合は、例えばプローブの5'側は、通常数個のメチレン鎖をリンカーとし、末端のリン酸基にFAM分子をリン酸エステルで結合し、また、3'側については下に示す構造単位を介し、アミド結合によりTAMRA分子を結合する。

【0026】

【化1】



【0027】本発明の方法は、本発明が対象とする、例えば抗炎症作用を有する薬剤を評価又は選択するために、エオタキシン、RANTES又はβ-ディフェニン-2の発現量の測定方法として、mRNAを測定する場合に特に有用である。この場合は、エオタキシン、RANTES又はβ-ディフェニンの発現を測定しようとする生物体の組織又は細胞を被験物質の存在下で培養し、培養細胞から常法に従ってmRNAを抽出し、次にそれに対して相補性のcDNAを常法に従って合成した後、本発明のプライマーとプローブを用いて、PCRを行えばよい。本発明はさら

に、上記の方法の実施のために使用されるキットをも提供する。このキットは上に定義したプライマー及びプローブを含んで成る。本発明のキットはさらに、対照として使用する核酸及びその核酸を測定するためのプライマー及びプローブを含んでいてもよい。

【0028】本発明の方法は、本発明が対象とする、例えば抗炎症作用を有する薬剤を評価又は選択するために、エオタキシン、RANTES又はβ-ディフェニン-2の発現量の測定方法として、mRNAを測定する場合に特に有用である。この場合は、特定のサイトカインの発現を

測定しようとする生物体の組織を採取し、常法に従って mRNA を抽出し、次にそれに対して相補性の cDNA を常法に従って合成した後、本発明のプライマーとプローブを用いて、PCR を行えばよい。本発明はさらに、上記の方法の実施のために使用されるキットをも提供する。このキットは上に定義したプライマー及びプローブを含んで成る。本発明のキットはさらに、対照として使用する核酸及びその核酸を測定するためのプライマー及びプローブを含んでいてもよい。

【0029】本発明の方法の実施のために使用する細胞としては、エオタキシン、RANTES 又は β -ディフェンシン-2 を発現し得る任意の動物細胞を使用することができ、例えば線維芽細胞又は、この細胞の培養細胞株等を使用することができ、これらの細胞や組織の由来としては、マウス、ラット、ヒト等の任意の動物からの細胞や組織を使用することができるが、ヒトの細胞を用いるのが好ましい。

【0030】ヒト皮膚線維芽細胞は、市販されており、例えばクラボウ（倉敷紡績株式会社）から入手可能である。ヒト線維芽細胞の培養は、動物細胞を培養するための常法に従って行えばよいが、10%ウシ胎児血清を含む DMEM 培地（ダルベッコ変法イーグル培地）が特に好ましい。

【0031】本発明のスクリーニング方法の実験においては、細胞を上記の培地中で、被検物質の存在下、及び対照としての非存在下で培養する。培養は 37℃ において、5 時間～24 時間行えばよい。培養後、RNA の単離及び cDNA の合成を行い、PCR を実施する。RNA の単離及び cDNA の合成については、実施例の項において記載する。PCR は常法に従って行えばよい。

【0032】本発明の測定対象となる遺伝子がコードしているケモカインあるいは β -ディフェンシン-2 は、次のごとく皮膚の炎症反応あるいは皮膚の抗菌性と関連している。

エオタキシン：好酸球、好塩基球にメインに作用するケモカインのうち、特に好酸球に特異的に作用する。好酸球の遊走・脱顆粒を引き起こす。アトピー性皮膚炎・寄生虫感染など慢性のアレルギーにおいて重要な役割を果たす。皮膚線維芽細胞が産生することが知られている。

【0033】RANTES：エオタキシンと同様に好酸球に対する作用で注目されているケモカイン。エオタキシンよりも作用するレセプター種が多く、CD45 陽性メモリー T 細胞に対しても遊走因子として働くことから T 細胞の活性化にも重要と考えられている。皮膚線維芽細胞や角化細胞が産生することが知られている。

β -ディフェンシン-2：皮膚角化細胞などの上皮系の細胞が産生する抗菌ペプチド。多くの種類の菌に対し、広く抗菌作用を有する。乾癬患者の皮膚から最初に見出された。アトピー性皮膚炎患者の黄ブ菌との関連などについて注目されている。

【0034】

【実施例】次に、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

一般的方法

RNA の単離

細胞を 2.2ml のチューブに入れ、2000Xg、5 分間、4℃ で遠心を行い培養液を除去する。残った細胞に ISOGEN（ニッポンジーン）を 1ml 加え、撹拌し室温で 5 分間放置する。

【0035】0.2ml のクロロホルムを加え、15 秒間撹拌を行う。2～3 分間、室温で放置後 12000Xg、15 分間、4℃ で遠心後水層を別のチューブに移す。それに 0.5ml のイソプロパノールを加え、5～10 分間室温で放置後 12000Xg、10 分間、4℃ で遠心を行い、沈殿物を得る。得られた沈殿物に 75% エタノールを加え、12000Xg、5 分間、4℃ で遠心を行い、沈殿物を得る。沈殿物を風乾後、蒸留水に溶かす（この溶液を RNA 溶液とする。）。

【0036】cDNA の合成

1 μ g の RNA を含む RNA 溶液 10.5 μ l に 5X First Strand Buffer (Gibco BRL) 4 μ l、0.1 M DTT (Gibco BRL) 2 μ l、0.5mg/ml oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer (Gibco BRL) 1 μ l、2.5mM dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) (宝酒造) 1 μ l、124 U/ μ l RNase Inhibitor (宝酒造) 0.5 μ l、200 U/ μ l M-MLV Reverse Transcriptase (Gibco BRL) 1 μ l の混合液を室温で 10 分間放置後、37℃ で 50 分間インキュベートする。

【0037】cDNA の測定

cDNA 5 μ l、10X PCR 緩衝液 (Perkin Elmer) 5 μ l、25 mM MgCl₂ (Perkin Elmer) 7 μ l、20 μ M フォワードプライマー 0.75 μ l、20 μ M リバースプライマー 0.75 μ l、3 μ M プローブ 5 μ l、2.5mM dATP (Perkin Elmer) 1 μ l、2.5mM dGTP (Perkin Elmer) 1 μ l、2.5mM dCTP (Perkin Elmer) 1 μ l、5mM dUTP (Perkin Elmer) 1 μ l、蒸留水 21.75 μ l、AmpliTaq[®] UNG (Perkin Elmer) 0.5 μ l、AmpliTaq[®] DNA Polymerase (Perkin Elmer) 0.25 μ l の混合液を ABI PRISM 7700 (Perkin Elmer) にセットし、PCR 反応を行う。温度条件は、50℃ で 2 分間、95℃ で 10 分間で保温した後に、(95℃ で 15 秒間、60℃ で 1 分間) のサイクルを 40 回行い、各サイクルごとに蛍光強度を測定する。

【0038】実施例 1. エオタキシンをコードする遺伝子の測定における標準曲線

エオタキシンをコードする遺伝子（鋳型）の初期分子量（濃度）と、蛍光強度がベースラインから離脱して増加し始めるまでの PCR のサイクル数 (Threshold Cycle) C_T との関係を試験した。鋳型遺伝子、フォワードプライマー、リバースプライマー及びプローブは次の通りであった。

【0039】鋳型：エオタキシン (Kitaura et al. J. Biol. Chem. Vol. 271, No. 13, p. 7725-7730 (1996))

フォワードプライマー：配列番号：4

リバースプライマー：配列番号：5

プローブ：配列番号：6

レポーター色素：FAM

クエンチャー色素：TAMRA

結果を図6に示す。これらの結果、遺伝子の測定においても核酸の分子数（濃度）と C_T の間に直線関係があり、本発明の方法によって核酸の正確な測定が可能であることが明らかになった。

【0040】実施例2. RANTESをコードする遺伝子の測定における標準曲線

RANTESをコードする遺伝子（鋳型）の初期分子量（濃度）と、蛍光強度がベースラインから離脱して増加し始めるまでのPCRのサイクル数(Threshold Cycle) C_T との関係を試験した。鋳型遺伝子、フォワードプライマー、リバースプライマー及びプローブは次の通りであった。

【0041】鋳型：RANTES (Schall, T.J. et al., J. Immunol. Vol. 141, p. 1018-1025 (1988))

フォワードプライマー：配列番号：7

リバースプライマー：配列番号：8

プローブ：配列番号：9

レポーター色素：FAM

クエンチャー色素：TAMRA

結果を図7に示す。これらの結果、遺伝子の測定においても核酸の分子数（濃度）と C_T の間に直線関係があり、本発明の方法によって核酸の正確な測定が可能であることが明らかになった。

【0042】実施例3. β -ディフェンシン-2をコードする遺伝子の測定における標準曲線

β -ディフェンシン-2をコードする遺伝子（鋳型）の初期分子量（濃度）と、蛍光強度がベースラインから離脱して増加し始めるまでのPCRのサイクル数(Threshold Cycle) C_T との関係を試験した。鋳型遺伝子、フォワードプライマー、リバースプライマー及びプローブは次の通りであった。

【0043】鋳型： β -ディフェンシン-2

フォワードプライマー：配列番号：10

リバースプライマー：配列番号：11

プローブ：配列番号：12

レポーター色素：FAM

クエンチャー色素：TAMRA

結果を図8に示す。これらの結果、遺伝子の測定においても核酸の分子数（濃度）と C_T の間に直線関係があり、本発明の方法によって核酸の正確な測定が可能であることが明らかになった。

【0044】実施例4. エオタキシンの発現に対するIFN- γ 及びIL-4の影響

ヒト線維芽細胞を直径6cmの培養皿でコンフルエントになるまで、10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地で培養し、実験に供した。種々の濃度のTNF- α 、IFN- γ 、IL-4を添加し、24時間、37℃で培養した。次に細胞からRNAを単離し、cDNAを合成したのち、本発明の方法に従い、エオタキシンの発現量を測定した。その結果、図9に示す通り、エオタキシンの発現に対して、IL-4は亢進作用を示し、IFN- γ は抑制作用を示した。

【0045】実施例5. RANTESの発現に対するIFN- γ 及びIL-4の影響

ヒト線維芽細胞を直径6cmの培養皿でコンフルエントになるまで、10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地で培養し、実験に供した。種々の濃度のTNF- α 、IFN- γ 、IL-4を添加し、24時間、37℃で培養した。次に細胞からRNAを単離し、cDNAを合成したのち、本発明の方法に従い、RANTES遺伝子の発現量を測定した。その結果、図10に示す通り、RANTESの発現に対して、IL-4は抑制作用を示し、IFN- γ は亢進作用を示した。

【0046】実施例6. β -ディフェンシンの発現に対するIFN- γ 及びIL-4の影響

ヒト線維芽細胞を直径6cmの培養皿でコンフルエントになるまで、10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地で培養し、実験に供した。種々の濃度のTNF- α 、IFN- γ 、IL-1 α を添加し、24時間、37℃で培養した。次に細胞からRNAを単離し、cDNAを合成したのち、本発明の方法に従い、RANTES遺伝子の発現量を測定した。その結果、図11に示す通り、 β -ディフェンシン2の発現はTNF- α 及びIL-1 α により誘導された。

【0047】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Shiseido

<120> Method for measuring nucleic acid encoding eotaxin, RANTES or beta-defensin-2 and kit therefor

<130>

<160>

【0048】

<210> 1

<211> 807

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<;223>; Nucleotide sequence of DNA encoding human eotaxin

<;400>; 1

```

gcattttttc aagttttatg atttatttaa cttgtggaac aaaaataaac cagaaaccac   60
cacctctcac gccaaagctc acaccttcag cctccaacat gaaggctctc gcagcacttc  120
tgtgctgtct gctcatagca gctgecttca gccccaggg gctcgtctgg ccagcttctg  180
tcccaaccac ctgctgcttt aacctggcca ataggaagat accccttcag cgactagaga  240
gtacaggag aatcaccagt ggcaaatgtc ccagaaaagc tgtgatcttc aagaccaaac  300
tgccaagga tatctgtgcc gacccaaga agaagtgggt gcaggattcc atgaagtatc  360
tgaccaaaa atctccaact ccaaagccat aaataatcac catttttgaa accaaaccag  420
agcctgagtg ttgcctaatt tgttttcct tcttacaatg cattctgagg taacctcatt  480
atcagtcaca agggcatggg ttttattata tatatatata tttttttttt aaaaaaaaaac  540
gtattgcatt taatttatgt aggttttaa acttatectc catgaatate agttattttt  600
aaactgtaaa gcttltgtca gattctttac cccctgggag ccccaattcg atccccgtc  660
acgtgtgggc aatgttcccc ctctctctc ttctctctg gaatcttgta aagtcctgg  720
caaatgatgat cagtatgaaa atgtcattgt tcttgtgaac ccaaagtggt actcattaaa  780
tggaagtaaa tgttgtttta ggaatac                                     807

```

【0049】

<;210>; 2

<;211>; 1160

<;212>; DNA

<;213>; Homo sapiens

<;223>; Nucleotide sequence of DNA encoding human RANTES

<;400>; 2

```

cctccgacag cctctccaca ggtaccatga aggtctccgc ggcacgcctc gctgtcatcc   60
tcattgtctc tgcctctgc gctcctgcat ctgctctccc atattctctg gacaccacac  120
cctgctgctt tgcctacatt gcccgccac tgcctctgct ccacatcaag gattatttct  180
acaccagtgg caagtgtccc aaccagcag tegtctttgt caccgaaaag aaccgccaag  240
tgtgtgccaa ccagagaag aaatgggttc gggagtacat caactctttg gagatgagct  300
aggatggaga gtcttgaac ctgaacttac acaaatttgc ctgtttctgc ttgctcttgt  360
cctagcttgg gagcttccc ctactatcc taccacccc gctccttgaa gggcccagat  420
tctgaccacg acgagcagca gttacaaaaa ccttcccag gctggacgtg gtggtcagc  480
cttglaatcc cagcacttgg ggagccaag gtgggtggat caattgaggt caggagtctg  540
agacagcctg gccaacatga lgaaaccca lgtgtactaa aaatacaaaa aattagccgg  600
gcgtggtagc gggcgctgt agtccagct actcgggagg ctgaggcagg agaatggcgt  660
gaacccggga gcggagcttg cagtgcgcg agatcgccc actgcactcc agcctgggcg  720
acagagcgag actcgtctc aaaaaaaaaa aaaaaataca aaaattagcc  780
gcgtggtggc ccacgcctgt aatccagct actcgggagg ctaaggcagg aaaattgttt  840
gaacccagga ggtggaggct gcagtgcgt gagattgtgc cacttactc cagcctgggt  900
gacaaagtga gactcgtca caacaacaac aacaaaaagc tcccccaact aaagcctaga  960
agagcttctg aggcgtgct ttgtcaaaag gaagtctcta ggttctgagc tctgctttg 1020
ccttgcttt gcaagggtc tgtgacaagg aaggaagtca gcctgcctct agaggcaagg 1080
aaggaggaa cactgcactc ttaagcttcc gcgtctcaa cccctcacag gagcttactg 1140
gcaaacatga aaatcgggg                                     1160

```

【0050】

<;210>; 3

<;211>; 336

<;212>; DNA

<;213>; Homo sapiens

<;223>; Nucleotide sequence of DNA encoding human beta-defencin-2

<;400>; 3

agactcagct cctggtgaag ctcccagcca tcagccatga gggctcttga tctctcttc 60
 tegttctctt tcatttctct gatgcctctt ccaggtgttt ttggtggtat aggcgatcct 120
 gtiacctgcc tlaagagtgg agccatatgt catccagtct ttgacctag aaggatataa 180
 caaatggca cctgtggtct ccttgaaca aaatgctgca aaaagccatg aggaggccaa 240
 gaagctgctg tggtgatgc ggattcagaa agggctccct catcagagac gtgcgacatg 300
 taaaccaa taaactatgg tgtccaaaga tacgca 336

【 0 0 5 1 】

<;210>; 4
 <;211>; 20
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;220>;
 <;223>; Forward primer for amplification of human gene for eotaxin
 <;400>; 4
 gccagcttct gtcccaacca 20

【 0 0 5 2 】

<;210>; 5
 <;211>; 20
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial sequence
 <;220>;
 <;223>; Reverse primer for amplification of human gene for eotaxin
 <;400>; 5
 ggcacagata tccttggcca 20

【 0 0 5 3 】

<;210>; 6
 <;211>; 33
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;220>;
 <;223>; Probe for detection of human eotaxin
 <;400>; 6
 ctgctgcttt aacctggcca ataggaagat acc 33

【 0 0 5 4 】

<;210>; 7
 <;211>; 22
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;220>;
 <;223>; Forward primer for amplification of human gene for RANTES
 <;400>; 7
 cgtctctatc ctcatgtgta ct 22

【 0 0 5 5 】

<;210>; 8
 <;211>; 27
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial sequence
 <;220>;
 <;223>; Reverse primer for amplification of human gene for RANTES
 <;400>; 8

- agctcatctc caaagagttg atgtact 27
- 【0056】
- <;210>; 9
 <;211>; 22
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;220>;
 <;223>; Probe for detection of human gene for RANTES
 <;400>; 9
- ccctctgcgc tcttgcattc gc 22
- 【0057】
- <;210>; 10
 <;211>; 21
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;220>;
 <;223>; Forward primer for amplification of human gene for beta-defensin-2
 <;400>; 10
- gcctcttcca ggtgtttttg g 21
- 【0058】
- <;210>; 11
 <;211>; 20
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;220>;
 <;223>; Reverse primer for amplification of human gene for beta-defensin-2
 <;400>; 11
- cgcacgtctc tgatgaggga 20
- 【0059】
- <;210>; 12
 <;211>; 33
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;220>;
 <;223>; Probe for detection of human gene for beta-defensin-2
 <;400>; 12
- tataggcgat cctgttacct gccttaagag tgg 33
- 【0060】
- <;210>; 13
 <;211>; 19
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;220>;
 <;223>; Forward primer for amplification of gene for glyceraldehyde-3-phos
 phate dehydrogenase
 <;400>; 13
- gaaggtgaag gtcggagtc 19
- 【0061】
- <;210>; 14
 <;211>; 20

<;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;220>;
 <;223>; Reverse primer for amplification of gene for glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase
 <;400>; 14
 gaagatggtg atgggatttc 20

【 0 0 6 2 】

<;210>; 15
 <;211>; 21
 <;212>; DNA
 <;213>; Artificial Sequence
 <;220>;
 <;223>; Probe for detection of gene for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
 <;400>; 15
 aggctgagaa cgggaagctt g 21

【 0 0 6 3 】

<;210>; 16
 <;211>; 360
 <;212>; DNA
 <;213>; Homo sapiens
 <;223>; Patial nucleotide sequence of rat gene for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
 <;400>; 16
 gctcggctgg cgacgcaaaa gaagatgcgg ctgactgtcg agccacatcg ctcagacacc 60
 atggggaagg tgaaggtcgg agtcaacgga ttgtgtcgta ttgggcgcct ggccaccagg 120
 gctgctttta actctggtaa agtggatatt gttgccatca atgacccctt cattgacctc 180
 aactacatgg ttacatggtt ccaatatgat tccacccatg gcaaattcca tggcaccgtc 240
 aaggtcgaga acgggaagct tgtcatcaat ggaaatccca tcaccaletl ccaggagcga 300
 gatccctcca aatcaagtg gggcgatgct ggcgctgagt acgtcgtgga gtccactggc 360

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 図 1 は、本発明の測定法の原理を示す図である。

【 図 2 】 図 2 は、エオタキシンをコードするヒト由来の cDNA のヌクレオチド配列と、それに対するプライマー及びプロブの位置を示す図である。

【 図 3 】 図 3 は、RANTES をコードするヒト由来の cDNA のヌクレオチド配列と、それに対するプライマー及びプロブの位置を示す図である。

【 図 4 】 図 4 は、 β -ディフェンシン-2 をコードするヒト由来の cDNA のヌクレオチド配列の 1 部分と、それに対するプライマー及びプロブの位置を示す図である。

【 図 5 】 図 5 は、グリセロアルデヒド-3-ホスフェート・デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子のヌクレオチド配列の 1 部分と、それに対するプライマー及びプロブの位置を示す図である。

【 図 6 】 図 6 は、エオタキシンをコードする遺伝子を本発明の方法により測定した場合の、鋳型核酸の初期分子数の対数と C_T との関係を示すグラフである。

【 図 7 】 図 7 は、RANTES をコードする遺伝子を本発明の方法により測定した場合の、鋳型核酸の初期分子数の対数と C_T との関係を示すグラフである。

【 図 8 】 図 8 は、 β -ディフェンシン-2 をコードする遺伝子を本発明の方法により測定した場合の、鋳型核酸の初期分子数の対数と C_T との関係を示すグラフである。

【 図 9 】 図 9 は、エオタキシンの発現に対する IFN- γ 及び IL-4 の影響を示すグラフである。

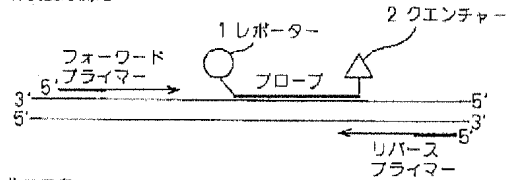
【 図 10 】 図 10 は、RANTES の発現に対する IFN- γ 及び IL-4 の影響を示すグラフである。

【 図 11 】 図 11 は、 β -ディフェンシンの発現に対する TNF- α 及び IL-1 α の影響を示すグラフである。

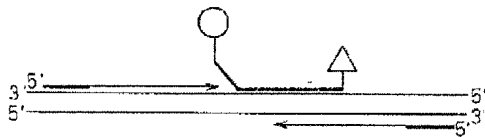
【図1】

図1

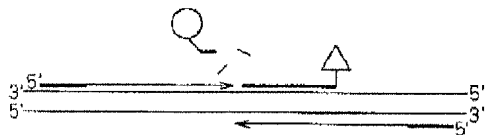
(A) 伸長反応開始



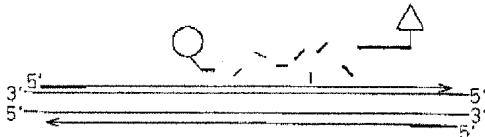
(B) 伸長反応



(C) 5'-3'ヌクレアーゼ活性によるリポーター色素のプロープからの解離



(D) 伸長反応終了



【図3】

RANTESをコードするDNAの塩基配列 (配列番号: 2)

```

1 cctcgcacag cctctccaa gtaacatga aggtctccg gccacgcctc gctgtcatcc
81 taattgtatc tgcctcttgc gctcctgcat ctgcctcccc atattctctg gacaccacac
121 cctgtgtggt tgcctacatt gccgcgcac tgcctcttgc cccatcctag gactatttct
181 aacacagtgg caagtgtcc aaccacgac tctgtttgt caccgaaag aaccgcacag
241 tctgtccaa cccagagaag aatgggttc ggggtacat caactcttg gagatgagct
301 aggatggaga gctctgaac ctgaacttac acaatttgc ctgtttolgo ttgtctttgt
361 cctagcttgg gaggctccc ctactatcc taccacccc gctccttga gggccagat
421 tctgaccacg acgagcagca gttaaaaaa cctccccag gctggactg ttggtctcag
481 ctgtantcc cagcacttg gaggccacg gtgggtgat cacttgagt caggagtto
541 agacagctg gccacatga tgaacccca tgttactaa aaatacaaa aattagccg
601 gctgtgtagc gggcgootgt agtccagct actcggagg ctgaggcag agaatggct
661 gaaccaggga gaggagctt cgtgagcgg agatcgccc actgactcc agcctggcg
721 ccagagcgag actcctctc aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaataca aattagcc
781 cgtgtgtac ccaagcctgt aatccagct actcggagg ctaaggcag aatttgtt
841 gaaccaggga gctgagctt cgtgagctt gactgtgtc cacttactc cagctgggt
901 gcaaaagtga gactcgtca caacacaaa acaaaaaa ttccccact aagcctaga
961 agagcttctg agggctgtgt ttgtaaaag gactgtctc gttctgagc tctgtctt
1021 ccttgctttt gaaaggctt tgtgacagg aggaagta cactgctct agaggcagg
1081 aaggagga caatgactc ttactcttc gcctctcaa cccctcagc gacttact
1141 gcaaaatga aatcgggg

```

3

【図2】

エオタキシンをコードするDNAの塩基配列 (配列番号: 1)

```

1 gcattttttc aagttttatg atttatttaa cttgtggaac aaaaataaac cagaaaccac
61 cactcttcac gccaaagctc acaccttcag cctccaacat gaaggctctc gcagcacttc
121 tctggctgtg gctcatagca gctgccttca gcccacagg gctcgtggg ccagcttctg
181 tcccaaccac ctgctgtttt aaactggcca ataggagat accccttcag cgaactagaga
241 gctacaggag aatcaccagt ggcaaatgt cccagaaagc tctgatotto aagaccaaac
301 tggccaagga tatctgtgc gacccaaga agaagtgggt gcaggattcc atgaagtato
361 tggacaaaa atctccaact ccaagccat aaataatcac cattttttaa accaaaccag
421 agcctgagtg ttgoolaat tllllccot lollaoatg cattctgagg taacctcatt
481 atcagtcaca agggcatggg ttttattata tatatatata ttttttttt aaaaaaaaac
541 gtattgcatt taatttattg aggttttaa acttatctc catgaatato agttattttt
601 aactgtaaa gotttgtgca gattttttc cccctggag ccccaattcg atccctgtc
661 acgtgtggg aatgttccc ctctctctc ttctctctg gaacttgtg aaggctctgg
721 caaagatgat cagtatgaaa atgtcattgt tcttggaac caaagtgtg actcattaaa
781 tggaaatgaa tgtgttttta ggaatac

```

2

【図4】

β-ディフェンシン-2 をコードする DNA の塩基配列 (配列番号: 3)

図
5

```

agactcagct cctggtgaag ctcccagcca tcagccatga gggtcttcta      50
tctctctctt togttoctet tcatatttct gatgcctctt ccaggtgttt      100
ttggtggtat aggcgcatcct gttacotgcc ttaagagtgg agccatattgt      150
catccagtct tttgccctag aaggatatasa caaatgggca cctgtggtct      200
ccctgggaaca aaatgctgca aaaagccatg aggaggccaa gaagctgctg      250
tggtgatgac ggattcagaa agggctccct catcagagac gtgcgacatg      300
taaaccaaat taaactatgg tgtccaanga taogca

```

【図5】

(F) GAPDH (配列番号: 18)

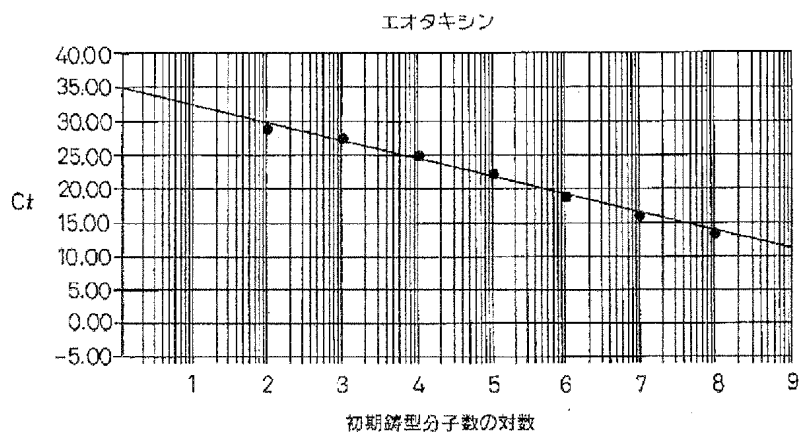
図
5

```

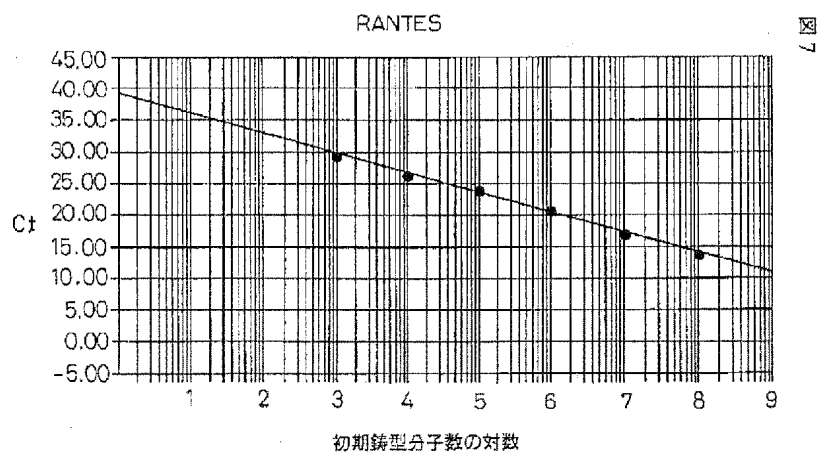
gtcgggtg cgacgcaaaa gaagatgcgg ctgactgtcg agccacatcg ctacagacacc      60
atggggaagg tgaaggtcgg agtcaacgga ttggtcgta ttggcgccct ggtcaccagg      120
gtgtgtttta actctggtaa agtggatatt gttgccatca atgacccctt cattgacctc      180
aactacatgg ttacatggtt ccaatatgat tccacccatg gcaaatcca tggcacccgc      240
aaggctgaga acgggaagct tgtcatcaat ggaatccca tcaccatctt ccaggagcga      300
gatccctcca aaatcaagig gggcgatgct ggcgctgagt acgtctgga gtccactggc      360

```

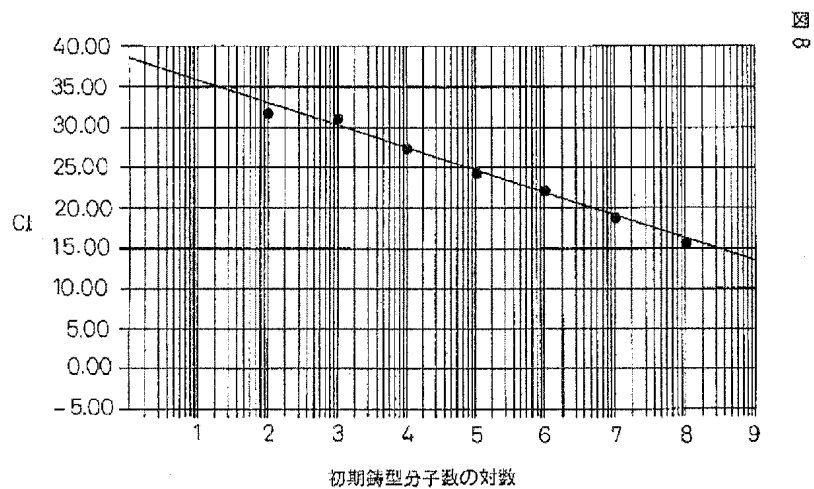
【図6】

図
5

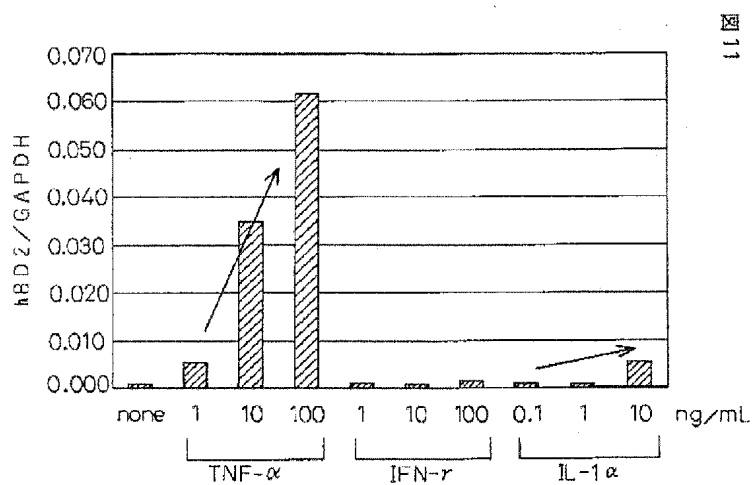
【図7】



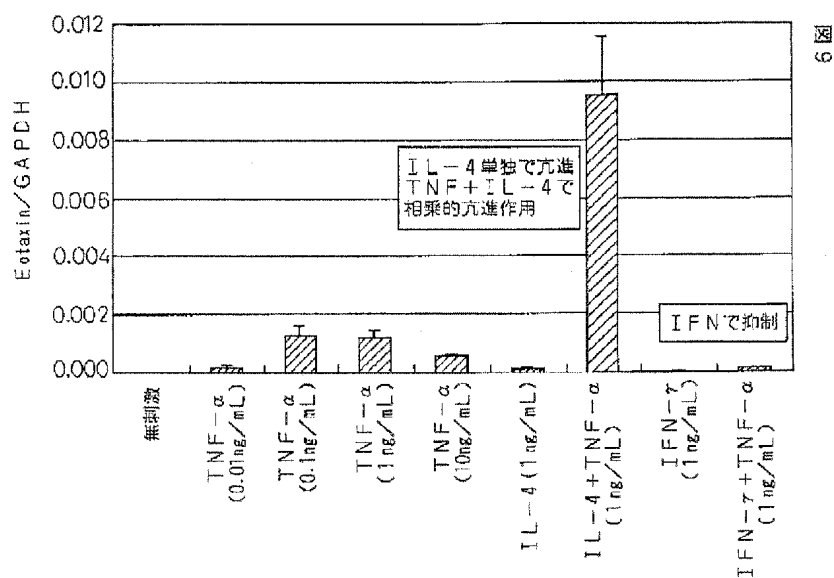
【図8】



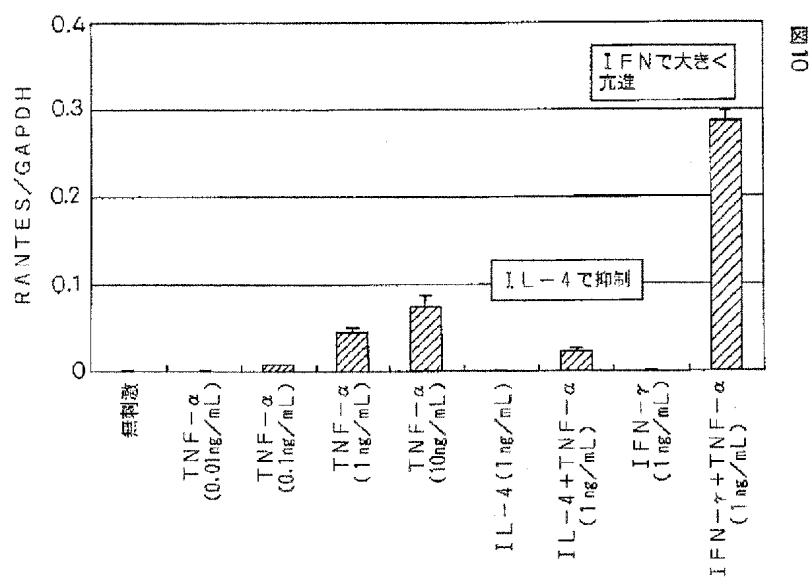
【図11】



【図9】



【図10】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

特許庁 (参考)

G 0 1 N 33/15

G 0 1 N 33/50

Z

33/50

33/53

M

33/53

33/566

33/566

C 1 2 N 15/00

Z N A A

(72) 発明者 市川 秀之

神奈川県金沢区福浦2-12-1 株式会社
資生堂リサーチセンター内

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA40 CB01 CB30 DA12

DA13 DA14 DA36 DA80 FB02

FB12 FB20 GC15

4B024 AA01 AA11 BA08 BA21 CA04

CA09 FA10 GA11 HA12

4B063 QA01 QQ08 QQ24 QQ43 QQ53

QR32 QR55 QR62 QS25 QS32

4C084 AA17 NA14 ZB112 ZB132